

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication :
 (à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)

2 736 051

(21) N° d'enregistrement national : 95 07860

(51) Int Cl⁶ : C 07 D 257/02, A 61 K 49/04//C 07 F 15/00C 07 M 1:00

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 29.06.95.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
 demande : 03.01.97 Bulletin 97/01.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
 recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
 établi à la date de publication de la demande.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
 apparentés :

(71) Demandeur(s) : GUERBET SA SOCIETE ANONYME
 — FR.

(72) Inventeur(s) : MEYER DOMINIQUE, ROUSSEAU
 OLIVIER, SCHAEFER MICHEL et SIMONOT
 CHRISTIAN.

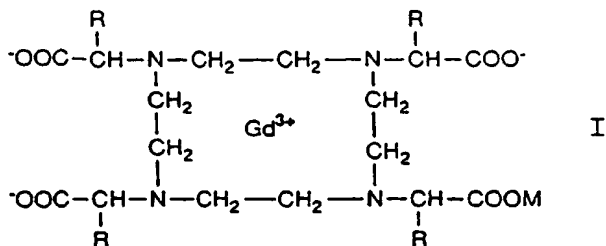
(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : CABINET LAVOIX.

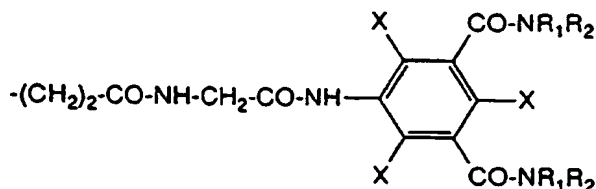
(54) COMPLEXES METALLIQUES DE POLYAMINOACIDES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEUR
 UTILISATION EN IMAGERIE DIAGNOSTIQUE.

(57) L'invention concerne des complexes du gadolinium de
 formule I:

Ces complexes sont utilisables dans le domaine de l'imagerie diagnostique.



dans laquelle R représente un groupe de formule:



FR 2 736 051 - A1



La présente invention concerne des complexes métalliques de polyaminoacides, leur procédé de préparation et leur utilisation en imagerie diagnostique.

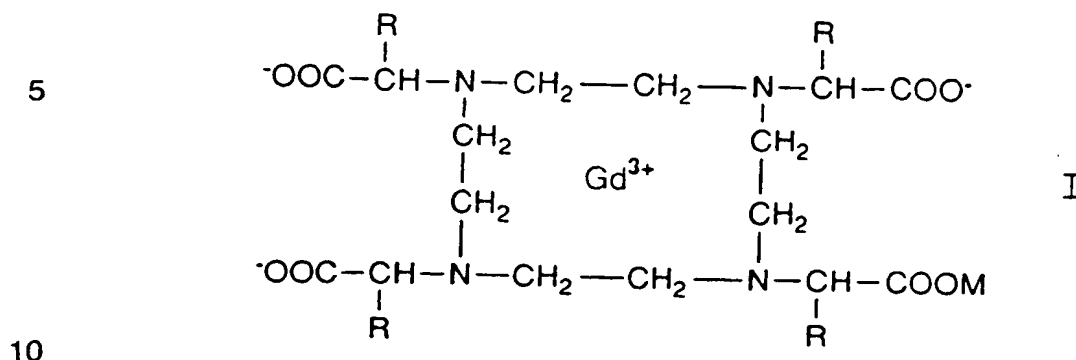
5 Ces composés sont des dérivés ramifiés de l'acide gadotérique, commercialisé sous forme de sel de méglumine sous la marque Dotarem®, comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique. Le gadotérate de méglumine est un complexe stable dont la relaxivité spin-réseau à 37° C et 20 MHz est environ 3,5 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, du même ordre de grandeur que celle des autres agents de
10 contraste commercialisés.

Les complexes de gadolinium selon l'invention ont des relaxivités R_1 supérieures à $20 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; ceci permet d'administrer au sujet, pour obtenir une même intensité de signal, une composition de diagnostic dont la concentration molaire en Gd^{3+} complexé, et donc en composé selon
15 l'invention, est 6 fois et même 10 fois inférieure aux concentrations actuellement utilisées en clinique.

Comme l'osmolalité et la viscosité des solutions des complexes de l'invention, pour une même relaxivité, sont nettement inférieures à celles du Dotarem® et même des composés non ioniques
20 comme le gadodiamide, on peut envisager d'utiliser des solutions dont la teneur pondérale en principe actif est supérieure à celles que l'on connaît pour obtenir des images de meilleure qualité, sans atteindre un niveau d'effets secondaires inacceptables.

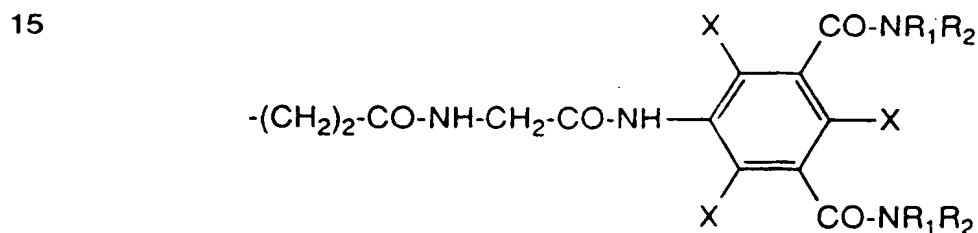
Outre l'ion métallique lourd Gd^{3+} , ces complexes comportent
25 des atomes de brome ou d'iode et sont opaques aux rayons X et ils sont suffisamment solubles, notamment par la présence de groupes hydrophiles autour des noyaux aromatiques, pour être utilisés en radiologie conventionnelle.

Les composés de l'invention ont pour formule :



dans laquelle

R représente un groupe

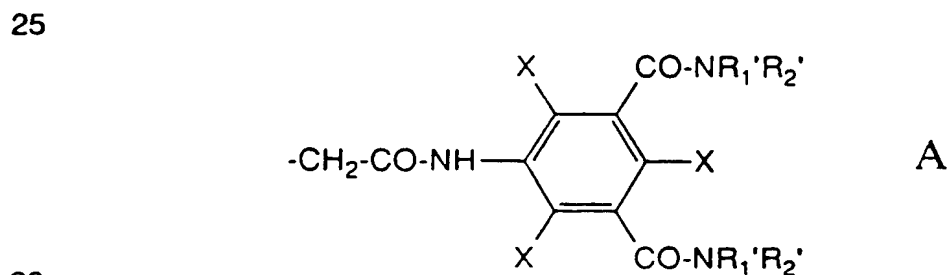


dans lequel X est Br ou I,

R₁ est H, (C₁-C₃)alkyle ou (C₂-C₈)mono- ou polyhydroxyalkyle et

R₂ est (C₂-C₈)mono- ou polyhydroxyalkyle, ou bien

R₁ est H et R₂ est un groupe



X étant tel que défini ci-dessus et

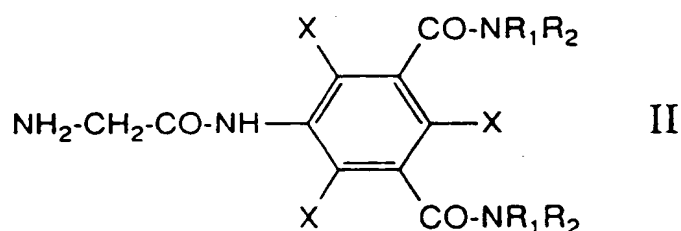
R'_1 et R'_2 prenant indépendamment l'un de l'autre l'une quelconque des significations données pour R_1 et R_2 , à l'exclusion de A,

étant entendu que $-\text{CO}-\text{NR}_1\text{R}_2$ ou $-\text{CO}-\text{NR}'_1\text{R}'_2$ comportent au moins 2 groupes hydroxyle, et M représente H ou un cation organique ou minéral. Parmi ceux pharmaceutiquement acceptables, on peut citer Na^+ ou ceux dérivés de la lysine, l'arginine, la N-méthylglucamine ou la diéthanolamine.

Les groupes alkyles peuvent être linéaires ou ramifiés.

On préfère les composés dans lesquels $-\text{CONR}_1\text{R}_2$, ou $-\text{CONR}'_1\text{R}'_2$ porte au moins 6 groupes hydroxyle et particulièrement représente $-\text{CON}(\text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH})_2$.

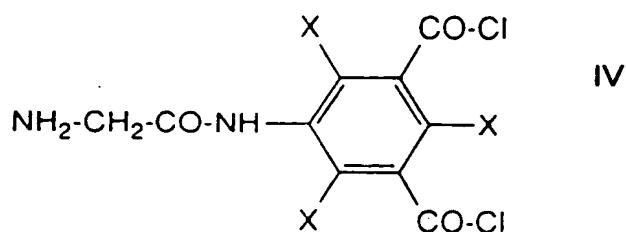
Les composés de formule I peuvent être préparés par action de l'amine de formule II



20 dans laquelle X, R_1 , R_2 sont tels que définis ci-dessus, sur le complexe du gadolinium de formule III répondant à la formule développée I dans laquelle $R = -(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$, en présence d'un agent d couplage, notamment de l'un de ceux utilisés en synthèse peptidique, tel qu'un carbodiimide, par exemple en solution aqueuse.

25 Les amines de formule II, pour lesquelles R_2 est distinct de A, peuvent être obtenues par réaction de HNR_1R_2 avec le dichlorure de diacide de formule IV :

5



10 dans lequel la fonction NH_2 est protégée sous forme de phtalimide, suivi d'une hydrazynolyse.

Les aminoalcools HNR_1R_2 sont connus ou peuvent être préparés par des méthodes analogues à celles décrites dans la littérature. On peut citer, en particulier, les aminoalcools commercialisés, définis par:

15

i) $\text{R}_1 = \text{H}$ et $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})_2$;

ii) $\text{R}_1 = \text{H}$ et $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$

ou $\text{CH}_2\text{-(CHOH)}_2\text{-CH}_2\text{OH}$;

iii) $\text{R}_1 = \text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$ et $\text{R}_2 = \text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ou R_1 ;

iv) la glucosamine,

20

et plus généralement ceux décrits dans EP-A-558 395, EP EP-A-25083 et EP-A-33 426.

25

Les amines de formule II pour lesquelles R_2 représente A et R_1 représente H sont simplement obtenues en faisant réagir une amine de formule H_2NA sur le dichlorure de diacide de formule IV préalablement N-protégé. On notera que l'amine H_2NA , laquelle correspond à une amine de formule II dans laquelle R_2 est distinct de A, peut être préparé conformément au procédé proposé ci-dessus.

30

Les compositions d'agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique qui contiennent un composé de formule I dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable sont un autre objet de l'invention.

Leur forme pharmaceutique sera adaptée à la voie d'administration.

De préférence, ces compositions d'agents de contraste seront des solutions aqueuses de sels physiologiquement acceptables du complexe de formule I. Les compositions de l'invention peuvent contenir en outre des stabilisants, divers additifs destinés à rendre la solution isotonique ou permettent de fixer son pH, ainsi que tout autre type d'additif couramment utilisé dans la technique.

La concentration de la composition sera adaptée à la voie et à la zone d'administration; elle sera en général comprise entre 0,01 M et 0,5 M et, de préférence, entre 0,05 M et 0,1 M.

La dose unitaire sera évidemment fonction de la structure du complexe et de la nature de l'examen; en général, on administrera de 0,005 mmole/kg à 0,1 mmole/kg.

Dans ce qui suit, on décrit les procédés de préparation du complexe de formule III, en solution aqueuse, de l'aniline de formule II dans laquelle $R_1 = R_2 = \text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$ et de celle dans laquelle $R_1 = \text{H}$ et $R_2 = \text{A}$ avec $R'_1 = R'_2 = \text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$.

Préparation du complexe de formule III

20

Etape a)

On verse lentement 167 g de 2-bromoglutarate de diméthyle dans une suspension de 30 g de 1,4,7,10-tétraazacyclododécane et 97 g de carbonate de potassium dans 875 ml d'acétonitrile; le mélange est agité, sous atmosphère inerte à 60° C pendant 48 heures au cours desquelles on ajoute 83 g de 2-bromoglutarate de diméthyle. Puis, à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et la solution concentrée à sec. L'huile résiduelle est purifiée par chromatographie sur silice, en éluant avec un gradient de dichlorométhane-méthanol (100/0 à 80/20) pour donner 43 g d'octaester sous forme d'huile.

30

Etape b)

5 L'huile précédente en solution dans 72 ml de méthanol est introduite dans une solution aqueuse de NaOH (68 g NaOH; 340 ml d'eau), et le mélange est maintenu sous agitation à 70° C pendant 48 heures.

Le méthanol est éliminé sous pression réduite et la phase aqueuse extraite avec du chlorure de méthylène, avant d'y introduire environ 800 ml de résine cationique échangeuse d'ions Amberlite®, commercialisée par Rohm et Haas, sous la désignation IRC 50 (acide faible).

Après 1 heure de contact, la résine est éliminée et on introduit dans la solution 680 ml de résine Amberlite® anionique échangeuse d'ions, désignée par IRA 458 (base forte).

15 Après 12 heures, la résine est séparée et introduite dans une colonne; le produit cherché est isolé par élution à l'aide de 4 l d'une solution aqueuse d'acide acétique 3N puis 4 l de solution 6N.

On obtient, après élimination du solvant sous pression réduite, 31 g de cristaux blancs.

20 RMN¹³C (200 MHz; DMSO-d₆; T = 30° C): 24; 31; 48; 62; 172; 174.

Etape c)

25 29,4 g de l'octaacide précédemment obtenu sont mis en suspension dans 530 ml d'eau, avec 15,8 g de GdCl₃ · 6 H₂O; sous agitation, une solution aqueuse de NaOH 1N est introduite lentement jusqu'à ce que le pH du milieu soit stabilisé à 6,5. Le milieu est alors filtré sur un filtre Millipore® de maille 0,45 µm et le filtrat concentré à sec. On obtient, après dessiccation 49,3 g de sel de sodium du complexe de gadolinium de formule III, sous forme d'un solide beige contenant le NaCl

30

formé au cours de la complexation.

Relaxivité R_1 (37°C ; 20 MHz) = $5,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$;

Chromatographie : HPLC sur colonne Licrosorb® Diol 5 μm
(Merck), éluant $\text{CH}_3\text{CN}/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,01 M (50/50 - v/v)

5

Temps de rétention : 2 minutes.

Préparation de l'amine de formule II dans laquelle $R_1 = R_2 = \text{CH}_2-(\text{CHOH})_4-$
 CH_2OH et $X = \text{I}$ (Composé IIa)

10

Etape a)

Sous agitation, on introduit peu à peu 179 g de chlorure de N-phthaloylglycine dans une solution à 0°C de 119 g de dichlorure de l'acide 5-amino-2,4,6-triiodoisophtalique dans 500 ml de diméthylacétamide; le mélange est agité plusieurs heures à 0°C puis, après une nuit à
15 température ambiante, il est introduit lentement dans 10 litres d'eau; le précipité formé est isolé et dissous dans 3 l d'acétate d'éthyle. Cette solution est lavée avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium, puis avec de l'eau, séchée, puis concentrée. On obtient 125 g du dichlorure de l'acide 2,4,6-triiodo-5-phthalimidoacétamidoisophtalique.

20

Etape b)

On maintient 5 heures à 80°C une solution, dans 1000 ml de diméthylacétamide, de 104 g du dichlorure d'acide précédent, 208 g de disorbitylamine et 50 ml de triéthylamine. Le précipité formé est séparé et
25 le solvant est éliminé par distillation sous pression réduite; le résidu est dissous dans l'eau à pH 3 et mis en contact avec 750 ml de résine cationique échangeuse d'ions Amberlite® commercialisée par Rohm et Haas sous la dénomination IRN 77 (acide fort). Après 2 heures d'agitation, on sépare la résine et on introduit dans la solution aqueuse (700 ml) du
30 diamide purifié, 17 ml d'hydrate d'hydrazine. Après 5 heures d'agitation à

80° C, le milieu est acidifié à température ambiante par addition de 26 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 10 N. Le précipité formé est isolé et la solution est passée sur une colonne de 500 ml d'une résine anionique faible échangeuse d'ions (Amberlite® IRA 67) puis 80 ml d'une
 5 résine cationique faible (Amberlite® IRC 50); on traite la solution obtenu par 4 l de résine Amberlite® acide fort, sur laquelle se fixe le produit final; il est élué par une solution aqueuse de NH_4OH . L'amine II est obtenue avec 70 % de rendement sous forme d'un solide beige.

10 Chromatographie HPLC : colonne LiCrosphère® C 18,5 μm (Merck) – h = 25 cm; d = 4 mm.

Eluant* : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{PIC}^\circ \text{ B8 } 0,05 \text{ M}$ (Waters) 5/95; débit : 1 ml/mn

Temps de rétention des isomères : 8 minutes environ

15 * : PIC B8 : mélange acide octane sulfonique/méthanol/ acétate de calcium/eau.

Préparation de l'amine de formule II dans laquelle $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$ et $\text{X} = \text{Br}$ (Composé IIb)

20 On applique le même mode opératoire que précédemment pour obtenir le produit souhaité. Le pic moléculaire de son spectre de masse par électrospray est correct. En chromatographie liquide haute performance, les temps de rétention des isomères sont d'environ 8 minutes dans les mêmes conditions que précédemment.

25 L'acide 5-amino-2,4,6-tribromoisophtalique de départ est préparé avec 85 % de rendement par action de 100 ml de brome sur une solution dans 1300 ml d'eau et 380 ml d'acide chlorhydrique concentré, de 87 g d'acide 5-aminoisophtalique.

CCM : SiO_2 Merck :

$\text{C}_6\text{H}_6/\text{CH}_3\text{COC}_2\text{H}_5/\text{HCO}_2\text{H}$ (60/25/11) $\text{R}_f = 0,8$;

30 $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}/\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5/\text{NH}_4\text{OH}$ (35/35/40) $\text{R}_f = 0,4$.

Le dichlorure d'acide correspondant est préparé de façon classique par action de SOCl_2 sur le diacide correspondant avec 88 % de rendement.

CCM : SiO_2 Merck :

5

CH_2Cl_2 $R_f = 0,9$.

Les phtalimides (dichlorure d'acide et diamide) ont respectivement des temps de rétention de 11 minutes et de 15 à 30 minutes en chromatographie liquide haute performance, sur colonne LiCrosphère® 100 RP18 (Merck) $l = 250$ mm; $d = 4$ mm, avec un débit de 1 ml/minute en éluant dans le premier cas avec un mélange 60/40 d'acétonitrile et de solution aqueuse 0,01 M de KH_2PO_4 et, dans le second cas, avec le même mélange dans les proportions 7/97 (v/v).

15

Préparation de l'amine de formule II avec $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{A}$, $R'_1 = R'_2 = \text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$, $X = \text{I}$ (Composé IIc)

Etape a)

On agite 24 heures à 70°C une solution, dans 400 ml de diméthylacétamide, 59 g du dichlorure de l'acide 2,4,6-triiodo-5-phtalimidoacétamidoisophtalique, 200 g de l'amine IIa obtenue, par mise en oeuvre du mode opératoire précédent et 29,5 ml de tributylamine.

Le solvant est alors éliminé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur 4 kg d'adsorbant XAD1600 (Rohm et Haas) en éluant avec un mélange $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$.

La solution aqueuse, qui contient 80 % du produit attendu, est traitée comme dans la préparation précédente par l'hydrate d'hydrazine pour donner l'amine II attendue avec un rendement de 85 % par rapport à l'amine IIa de départ.

30

Chromatographie : gel Superdex® 30 en colonne 16

mm/60 cm (Pharmacia).

Eluant : tampon NaCl 0,1 M/NaH₂PO₄ 0,05 M/NaN₃ 0,01 M
pH = 7,2;

Débit 1 ml/minute;

5 Volume d'élution : 102 ml pour 1 mg dans 250 µl.

HPLC colonne Symmetry® C 18,5 µm (Waters) l = 25 cm
d = 4,6 mm;

Eluant : CH₃CN/KH₂PO₄ 0,01 M (15/85) (sans CH₃CN
pendant 5 minutes);

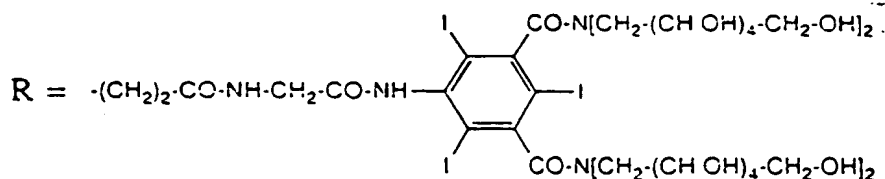
10 débit 1 ml/mn;

Temps de rétention des isomères : 18 mn environ.

Exemple 1

Composé de formule I dans laquelle M = Na et

15



20

On maintient 48 heures à température ambiante, sous agitation, 1 g du complexe de gadolinium de formule III, 5g du composé IIa et 6,8 g de chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthyl-carbodiimide dans 13 ml d'eau; le pH du milieu réactionnel est maintenu à 7, par addition à plusieurs reprises d'une solution aqueuse de HCl 1N.

25

Le milieu réactionnel auquel on a ajouté 50 ml d'eau est soumis à une ultrafiltration avec une cassette miniset de type nova commercialisée par la Société Filtron (U.S.A.) comportant une membrane de 5 KDa de seuil de coupure.

30

On obtient 2 g de produit brut sous forme de sel de sodium qui peut être purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur une

colonne de gel Superdex®, commercialisé par Pharmacia, en éluant à l'eau.

Chromatographie HPLC : colonne Licrosorb® Diol 5 μ m
(Merck)

Eluant : KH₂PO₄ 0,01 M/CH₃CN (45/55)

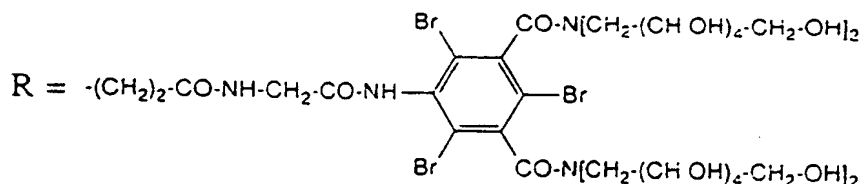
Débit 1 ml/mn

Temps de rétention : 6 minutes

R_i (37° C – 20 MHz) = 27 mM⁻¹s⁻¹.

Exemple 2

Composé de formule I dans laquelle M = Na et



On introduit peu à peu 50 g de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide dans une solution, dans 100 ml d'eau, de 7,4 g du complexe de gadolinium de formule III et 37 g de l'amine IIb, en maintenant le milieu à pH 7 par addition de HCl 1N. Après 48 heures d'agitation à température ambiante, le milieu est soumis à une ultrafiltration, comme à l'exemple 1, mais avec une membrane de 3 KDa de seuil de coupure, puis il est mis en contact avec 500 ml de résine anionique échangeuse d'ions Amberlite® IRA 458 (base forte).

Après élimination de la résine et évaporation de l'eau, on obtient 14 g du produit attendu sous forme d'un solide beige.

Chromatographie : HPLC colonne Licrosorb® Diol 5 μ m;

Eluant KH₂PO₄ 0,01 M /CH₃CN (45/55 – v/v);

Debit 1ml/mn;

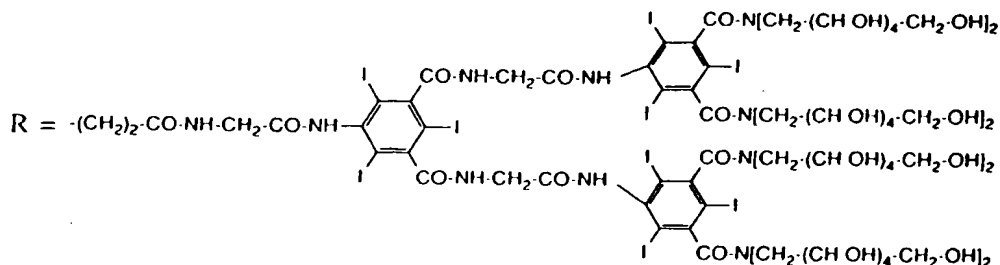
Temps de rétention : 5 minutes;

R_i (37° C – 20 MHz) = 25 mM⁻¹s⁻¹.

Exemple 3

Composé de formule I dans laquelle M = Na et

5



10

On dissout 0,3 g du complexe du gadolinium de formule III et 3,5 g du composé IIc dans 10 ml d'eau et on introduit goutte à goutte une solution d'HCl 1N jusqu'à pH 6,5, puis on ajoute 1,1 g du chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3 éthylcarbodiimide.

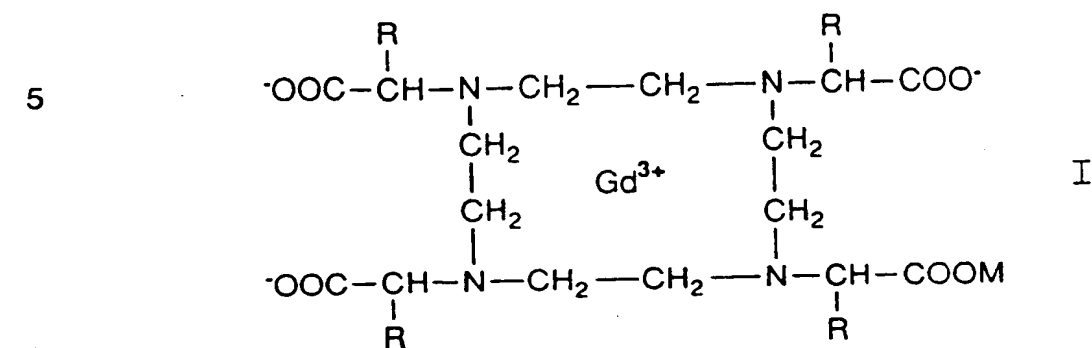
15

Après 24 heures d'agitation à température ambiante, on ajoute 80 ml d'eau et on purifie comme précédemment, le milieu par ultrafiltration avec une membrane de 8 KDa de seuil de coupure, pour isoler 1,5 g du sel de sodium du complexe attendu sous forme d'une poudre blanche.

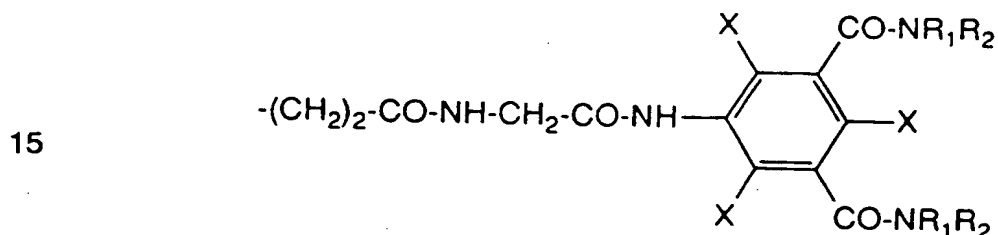
20

REVENDICATIONS

1. Complexe de gadolinium de formule :



dans laquelle R est un groupe de formule :



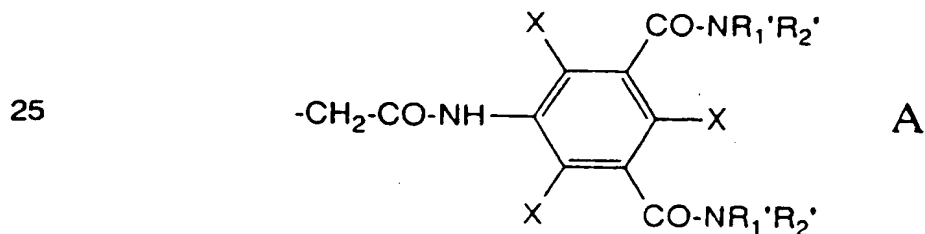
dans lequel

X est Br ou I

20 R₁ est H, (C₁-C₃)alkyle ou (C₂-C₈)mono- ou polyhydroxyalkyle et

R₂ est (C₂-C₈)mono- ou polyhydroxyalkyle, ou bien

R₁ est H et R₂ est un groupe de formule :



30 X étant tel que défini ci-dessus et R'₁, R'₂ prenant l'une quelconque des significations données pour R₁, R₂, à l'exclusion de A, étant entendu que -

$\text{CO-NR}_1\text{R}_2$ ou $-\text{CO-NR}'_1\text{R}'_2$ comportent au moins 2 groupes hydroxyles, et M représente H ou le cation d'une base minérale ou organique.

2. Complexe selon la revendication 1 de formule I, dans laquelle $-\text{CONR}_1\text{R}_2$ ou $-\text{CONR}'_1\text{R}'_2$ porte au moins 6 groupes hydroxyle.

5 3. Complexe selon l'une quelconque des revendications précédentes de formule I, dans laquelle M est un cation organique ou minéral choisi parmi Na^+ et les cations dérivés de la lysine, l'arginine, la N-méthylglucamine ou la diéthanolamine.

10 4. Complexe selon l'une quelconque des revendications précédentes de formule I, dans laquelle R_1 et R_2 représentent $\text{CH}_2-(\text{CHOH})_4-\text{CH}_2\text{OH}$.

5. Complexe selon l'une quelconque des revendications précédentes de formule I, dans laquelle R_1 est H, R_2 est A et R'_1 et R'_2 représentent $\text{CH}_2-(\text{CHOH})_4-\text{CH}_2\text{OH}$.

15 6. Composition d'agent de contraste pour IRM, caractérisée en ce qu'elle comprend un complexe selon l'une des revendications 1 à 5 sous forme de sel avec une base pharmaceutiquement acceptable, en association avec un véhicule pharmaceutique.

